

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-189849

(43)Date of publication of application : 08.07.2003

(51)Int.Cl.

C12N 5/10
A01K 67/00
A01K 67/027
A61K 45/00
A61P 17/14
C12Q 1/02
// C12N 15/09

(21)Application number : 2002-257666

(71)Applicant : SHISEIDO CO LTD

(22)Date of filing : 03.09.2002

(72)Inventor : TSUNENAGA MAKOTO
IDETA TATSUO

(30)Priority

Priority number : 2001270100 Priority date : 06.09.2001 Priority country : JP

(54) HAIR FOLLICLE-RECONSTITUTION SYSTEM AND ANIMAL CARRYING THE SAME

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide an experimental animal which is usable in evaluating factors affecting hair growth and hair color.

SOLUTION: This experimental animal carrying hair follicles which are reconstituted with hair papilla cells, epidermal cells, and melanocytes that are foreign to the cells.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 11.07.2003

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003-189849

(P2003-189849A)

(43)公開日 平成15年7月8日(2003.7.8)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	ページ* (参考)
C 1 2 N 5/10		A 0 1 K 67/00	D 4 B 0 2 4
A 0 1 K 67/00		67/027	4 B 0 6 3
67/027		A 6 1 K 45/00	4 B 0 6 5
A 6 1 K 45/00		A 6 1 P 17/14	4 C 0 8 4
A 6 1 P 17/14		C 1 2 Q 1/02	

審査請求 未請求 請求項の数13 O L (全 8 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2002-257666(P2002-257666)	(71)出願人	000001959 株式会社資生堂 東京都中央区銀座7丁目5番6号
(22)出願日	平成14年9月3日(2002.9.3)	(72)発明者	常長 誠 神奈川県横浜市都筑区早渕2-2-1 株 式会社資生堂リサーチセンター
(31)優先権主張番号	特願2001-270100(P2001-270100)	(72)発明者	出田 立郎 神奈川県横浜市都筑区早渕2-2-1 株 式会社資生堂リサーチセンター
(32)優先日	平成13年9月6日(2001.9.6)	(74)代理人	100060782 弁理士 小田島 平吉 (外1名)
(33)優先権主張国	日本 (J P)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 毛包再構成系およびその担持動物

(57)【要約】

【課題】 発毛および毛の色の濃淡に影響を及ぼす要因を評価しうる実験動物の提供。

【解決手段】 毛乳頭細胞および表皮細胞と、これらの細胞に対して外来のメラノサイトとを用いて再構成された毛包を担持する実験動物。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 毛乳頭細胞または毛乳頭細胞を含む真皮細胞および表皮細胞と、これらの細胞に対して外来のメラノサイトとの組み合わせからなる毛包を再構成するための系。

【請求項2】 外来のメラノサイトが毛乳頭細胞または毛乳頭細胞を含む真皮細胞および表皮細胞とは異種の起源に由来する請求項1記載の系。

【請求項3】 外来のメラノサイトがヒト由来であり、そして毛乳頭細胞または毛乳頭細胞を含む真皮細胞および表皮細胞が同一種の同一または異なる動物系統に由来し、かつ、該動物がマウス、ラットからなる群より選ばれる請求項1または2記載の系。

【請求項4】 外来のメラノサイトがヒト由来であり、毛乳頭細胞を含む真皮細胞がICR系統のアルビノマウスおよびメラノサイト欠損系統のマウスからなる群より選ばれるマウス由来であり、そして表皮細胞がICR系統のアルビノマウスおよびメラノサイト欠損系統のマウスからなる群より選ばれるマウス由来である請求項1〜3のいずれかに記載の系。

【請求項5】 レシピエント動物に請求項1〜4のいずれかに記載の系が移植され、こうして再構成毛包を担持することになったキメラ動物。

【請求項6】 レシピエント動物が免疫系の抑制された動物であり、外来のメラノサイトがヒト由来である請求項5記載のキメラ動物。

【請求項7】 レシピエント動物がヌードマウス、スキッドマウス、ヌードラットからなる群より選ばれる免疫系が抑制された動物である請求項4または5記載のキメラ動物。

【請求項8】 外来のメラノサイトがヒト由来であり、毛乳頭細胞を含む真皮細胞がICR系統のアルビノマウスおよびメラノサイト欠損系統のマウスからなる群より選ばれるマウス由来であり、そして表皮細胞がICR系統のアルビノマウスおよびメラノサイト欠損系統のマウスからなる群より選ばれるマウス由来である請求項7記載のキメラ動物。

【請求項9】 請求項5〜8のいずれかに記載のキメラ動物を被験動物として用意し、該被験動物をある一定の手段で処置し、こうして処置された被験動物の再構成毛包におけるメラノサイトの活性をモニターし、未処置対象に対する該活性の変化の程度（または差異）を該手段によるメラノサイトの活性化能と関連付けることを特徴とする、ある一定の手段のメラノサイトの活性化能の評価方法。

【請求項10】 メラノサイトがヒト由来であり、メラノサイトの活性の変化の程度が再構成毛包からの毛髪または該毛包近傍の表皮におけるメラニン色素量の多寡により決定される請求項9記載の評価方法。

【請求項11】 メラノサイトの活性化能が抗白髪性で

ある請求項10記載の評価方法。

【請求項12】 該手段が化学物質または薬物である請求項9〜11のいずれかに記載の評価方法。

【請求項13】 請求項12に記載の評価方法でメラノサイトの活性化能を向上しようと評価された薬物を有効成分とする抗白髪剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、毛包再構成系を担持する実験動物、ならびにその作出のための細胞系および使用に関する。

【0002】

【従来の技術】特定の目的に向けられた動物反応を安定に再現することのできる多種多様のキメラ動物またはトランスジェニック動物は、主として、特定の疾患のモデルとして、または特定の疾患の病因を解明するために開発されている。例えば、毛髪再構成アッセイ用として、毛芽（特殊なケラチノサイト集塊として新生仔マウスの皮膚に存在する毛包前駆細胞）が、毛髪誘発性の毛乳頭細胞（ラットのヒゲ由来）と一緒に移植されたヌードマウスが開発されている（Lichti et al., J. Invest Dermatol 101:124-129, 1993）。

【0003】また、新生仔マウスの毛芽に由来する培養ケラチノサイトと毛乳頭細胞とが移植されたマウスでは、その移植領域の組織学的な解析により完全に組織化された上皮と毛包の再構成が確認されている（Kamimura et al., J. Invest Dermatol 109:534-540, 1997）。かような再構成毛包はin vivoでの毛髪の誘発についての信頼のおける機能性のアッセイに使用されることが示唆されている。

【0004】他方、毛髪の誘発と相俟って言及することのできる事象として毛の色調を挙げることができる。毛の色調は多くの場合、毛母細胞（hair matrix）の近傍に存在するメラノサイトによって産生され、毛を形成する細胞に与えられるメラニンによりもたらされるものとみなされている。白髪になるのは、かようなメラノサイトがメラニンを産生しなくなるか、メラニンを産生しても極めて少量であるか、またはメラノサイトが減少ないしは消滅することが主要原因であるといわれている。しかし、毛周期に関連して考慮する場合、退行期（毛の増殖が止まり、毛包の短縮および棍毛の形成）および休止期を通じて毛包から激減または消失したメラノサイトは、次期成長期においてどのように補充され、そして毛の色調を整えることができるのか（どこから来るのか）、等については明らかでない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】したがって、毛の色調を整えることのできる手段、換言すれば、ある一定の手

段が白髪防止もしくは抗白髪作用を奏するか否かを評価できるイン・ビボの評価系を提供することは価値がある。こうして、本発明の目的は、かかる評価系を提供することにある。なお、本明細書にいう、「抗白髪性」または「抗白髪作用」とは、例えば、メラノサイトの増殖促進、遊走能力促進、分化能促進、生存能力の増進、メラニン産生能等からなる群より選ばれる一種以上の活性で評価できる白髪化を抑制しうる特性であり、毛の色によりそれらの活性が示される性質を意味する。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記目的を達成すべく検討してきたところ、上述の毛包の再構成が確認されている、所謂、再構成毛包が、同種または異種のいずれの外来のメラノサイトを加えても再構成でき、しかもこうして構成された毛包のメラノサイトは活性な状態に維持できることを見出した。

【0007】したがって、本発明によれば、毛乳頭細胞および表皮細胞と、これらの細胞に対して外来のメラノサイトとの組み合わせからなる毛包を再構成するための系が提供される。

【0008】別の態様の本発明として、レシピエント動物に上記系が移植され、こうして再構成毛包を担持するキメラ動物が提供される。

【0009】また、別の態様の発明として、上記キメラ動物を被験動物として用意し、該被験動物をある一定の手段で処置し、こうして処置された被験動物の再構成毛包におけるメラノサイトの活性をモニターし、未処置対象に対する該活性の変化の程度を該手段のメラノサイトの活性化能と関連付けることを特徴とする、ある一定の手段のメラノサイトの活性化能の評価方法も提供される。

【0010】

【発明の具体的な態様】本明細書において、「毛乳頭細胞 (dermal papillae)」(以下、DP という場合あり) は、本発明の目的に沿う限り、広く毛包最下部にある毛乳頭細胞およびその周辺の細胞および組織を包含する概念を表わすものとして使用されている。このような組織としては毛乳頭細胞を含有する真皮を挙げることができる。限定されるものでないが、このような細胞は、マウスに由来する細胞を例にすれば、バーシカンプロモーターの下流に適当なレポーター遺伝子 (例えば、LacZ 遺伝子、グリーン蛍光タンパク質 (GFP) の構造遺伝子) をつないだ発現ベクターを導入したトランスジェニックマウス (Ver-LacZ) から生まれた新生仔 (生後4日以内に使用) から、レポーター遺伝子の発現を目印にして取得することができる。また、毛乳頭細胞を含有する真皮としては、皮膚から通常の調製方法によって取得される真皮が、一般に、毛乳頭細胞を含むので、そのまま、本発明の毛乳頭細胞として使用することもできる。

【0011】他方、「表皮細胞」は、皮膚の表皮または上皮の大部分を構成する細胞であり、真皮に接する1層の基底細胞から生じる。マウスを例にすると、かような表皮細胞としては新生仔 (もしくは胎児) に由来する表皮細胞が好ましく使用できるが、ケラチノサイトの形態にある細胞の培養物であってもよい。かような細胞は、それ自体公知の方法により所望のドナー動物の皮膚から調製することができる。

【0012】上記の毛乳頭細胞または毛乳頭細胞を含む真皮細胞と表皮細胞は、レシピエント動物に移植可能であれば、それらのドナー動物の種を問うことなく使用できるが、レシピエント動物と同種の動物に由来するものが好ましい。限定されるものでないが、レシピエント動物がマウスである場合、上記両細胞はいずれもマウス由来であることができ、他方、両細胞が同じマウスの系統に由来するものでなくてもよい。したがって、毛乳頭細胞または毛乳頭細胞を含む真皮細胞を、その確認が容易な上述のいずれかのトランスジェニックマウス (例えば、Ver-LacZ 系統) から取得し、他方、表皮細胞を、例えば、アルビノ (チロシナーゼの遺伝的欠陥を有する) の性質をもつ ICR 系統およびメラノサイト欠損系統 (例えば、W^{sh}/W^{sh} マウス) からなる群より選ばれるマウスから取得したものを使用してもよい。本発明に従えば、かようなアルビノもしくはメラノサイト欠損の性質をもつ動物由来の表皮細胞の使用が、後述する外来のメラノサイトの挙動をより容易にモニターできるので好ましい。また、上記のトランスジェニックマウスも ICR 系統およびメラノサイト欠損系統からなる群より選ばれるマウス由来であることもできる。

【0013】本明細書の「外来のメラノサイト」における「外来」とは、毛乳頭細胞または表皮細胞の起源と起源が異なることを意味する。したがって、メラノサイトには、毛乳頭細胞または表皮細胞の起源と異種動物に由来するもののみならず同種同系統であっても毛乳頭細胞または表皮細胞を採取した個体と異なる個体に由来するものをも包含する。このことは、仮りに、毛乳頭細胞または表皮細胞調製物に生来のメラノサイトが混在する場合であっても、かようなメラノサイト以外の追加のメラノサイトが、目的の系に必ず含まれることを意味する。

【0014】しかし、限定されるものでないが、毛乳頭細胞または表皮細胞がマウス由来である場合、メラノサイトは、マウス以外の動物、例えばヒト由来であることが好ましい。このような好ましい組み合わせを用いると、再構成毛包において、メラノサイトの分化状態に関わりなくメラノサイトの分布をトレースすることができる (例えば、ヒトメラノサイトに対する抗体もしくはヒトに対する特異的抗体またはヒトの特異的遺伝子配列もしくはヒトメラノサイトの特異的遺伝子配列の使用)。本発明に従えば、毛乳頭細胞 (マウス)、表皮細胞 (マ

ウス) およびメラノサイト (ヒト) からなる、所謂、キメラ再構成毛包において、メラノサイトがその活性 (例えば、メラニン産生活性) を維持しうることに特徴がある。また、後述する評価方法においてはヒトメラノサイトに作用しうる手段を探索できる点も本発明に備わる特徴である。

【0015】本発明で用いることのできるメラノサイトは、本発明の目的に沿って、メラニン色素の産生能を有するものであれば、いかなる種の動物に由来するものであってもよいが、上記のような特徴を活かすには、上述のとおり、ヒト由来のメラノサイトが好ましい。メラノサイトは、適当な組織、例えば表皮、さらに包皮、等からそれ自体公知の方法で調製することができる。また、市販品を使用することもできる。例えば、ヒト由来の培養メラノサイトは、NHEM細胞の名称の下にCascade社またはクラボウ社等から入手できる。

【0016】他方、以上の毛乳頭細胞および表皮細胞は、上述のとおり、それらのレシピエント動物と同種の動物に由来するものが好ましく、本発明の目的上、かかる動物の具体的なものとしては、マウス、ラットを挙げることができる。

【0017】本発明の「毛包を再構成するための系」は、上記の毛乳頭細胞および表皮細胞と、外来のメラノサイトとの組み合わせからなる。かような「組み合わせからなる・・・系」とは、上記の各細胞を一体として含む場合だけでなく、将来一体として使用する目的で各細胞が個別に保存されるように、例えば、個別の容器に入れられている形態をも包含する意味を有する。したがって、それらが上記の系を再構成する目的で使用される限り、本発明の範囲内にある。また、「毛包を再構成する」とは、レシピエント動物において、発毛または育毛を支持しうる器官として役立ちうる再構成毛包 (またはキメラ毛包) をもたらしうることを意味する。このような器官には、毛乳頭細胞、毛母細胞、毛包上皮系細胞・組織 (例えば、毛根鞘)、脂腺、毛包をとりまく結合組織等が含まれるであろう。

【0018】本発明に従う、上記の系は、適当なレシピエント動物に移植した場合に、再構成毛包を担持するキメラ動物を提供しうる。かかるキメラ動物は、毛包内に活性な (好ましくは、異種動物由来) メラノサイトを有するので、メラノサイトの機能またはメラノサイトの活性に影響を及ぼしうる手段 (薬物および環境等を含む) の評価をする上で有用である。レシピエント動物は、該動物に移植される系に含まれる各細胞の起源に拘わりなく、免疫系が抑制された動物であることが好ましい。また動物種としては、実験動物として使用しうるものであり、本発明の目的に沿うものである限り、いかなる動物であってもよいが、好ましくは、マウス、ラット等を挙げることができる。このような動物のうち、免疫系が抑制されているものとしては、マウスを例にすれば、ヌー

ドマウスのように、胸腺欠損のごとき形質をもつものが挙げられる。なお、本発明の目的を考慮すれば、特に好ましいレシピエント動物としては、市販のヌードマウス (例えば、Balb-cnu/nu系統)、スキッドマウス (例えば、Balb/c-SCID)、ヌードラット (例えば、F344/N Jcl-rnu) を挙げることができる。このようなレシピエント動物を使用し、そして表皮細胞としてアルビノの性質を持つマウス (例えば、ICR系統) またはメラノサイト欠損マウス (例えば、Wsh/Wsh) 由来のものを使用して得られる再構成毛包は、該毛包に含まれるメラノサイトの活性のトレースが容易である点で特に好ましい。

【0019】本発明に従えば、上記のメラノサイトがヒト由来であっても、上記の特に好ましいレシピエント動物、表皮細胞を使用することによって、再構成毛包からメラニン色素を含む毛が誘発および発育する。また、毛包の周辺領域にもメラニン色素の産生が観察できる。さらに、移植後6週目の毛の実体顕微鏡観察によると、その間に毛の色が、例えば灰色から白に変わることはなく、メラニンを産生するメラノサイトが長期間、再構成毛包に存在していることが確認されている。さらにまた、移植に際して、ヒト由来のメラノサイトの混合量が多いと毛の色が、一般に、濃くみえることから、再生された毛の色は毛乳頭細胞周囲のヒト由来のメラノサイトのメラニン産生量に依存するものとみなされる。

【0020】かような、本発明に従う、毛包を再構成するため系をレシピエント動物に移植する方法は、それ自体公知の移植方法によることができる。例えば、ヌードマウスの背部に該系を移植する場合、その背部の直径約1cmの円に対し、毛乳頭細胞は、約50万~1000万個、好ましくは約100万~約400万個、マウス表皮細胞は、約100万~4000個、好ましくは約1000万~約2000万個使用し、培養ヒトメラノサイト (DARK) は、約50万~1000万個、好ましくは、約100万個~500万個、使用することができる。

【0021】以上のような再構成毛包を担持するキメラ動物は、再構成毛包から、長期にわたってメラニンを含む毛を誘発し、そして育成しうるので、毛の成長および毛の色を濃くするのに関与する細胞もしくは組織、または器官、例えば、メラノサイト、毛乳頭、毛母細胞等が正常に働いているものとみなされる。したがって、本発明に従うキメラ動物は、

- 1) メラノサイトを活性化させることにより、毛の色を濃くする作用のある薬物のスクリーニング、
- 2) 毛乳頭を活性化させることにより、毛の成長を促し、毛全体の色を濃くする作用のある薬物のスクリーニング、
- 3) 毛母細胞を刺激することにより毛の成長を促し、毛全体の色を濃くする作用のある薬物のスクリーニング、

4) 毛乳頭を刺激することにより毛包内のメラノサイトを活性化させ、毛の色を濃くする作用のある薬物のスクリーニング、

5) 毛母細胞を刺激することにより毛包内のメラノサイトを活性化させ、毛の色を濃くする作用のある薬物のスクリーニング、

6) 上記の作用のうちいずれか、あるいは全体の組み合わせにより、毛の色を濃くする作用のある薬物およびその組み合わせ作用を有する薬物のスクリーニング、等に使用できる。なお、本発明に従うメラノサイトの活性化薬物または化学物質の範囲には、メラノサイトの成長、分化、増殖、生存、運動能力のうちのいずれかまたは、いずれかの活性のうちいくつか、あるいはすべてを刺激し活性化することにより、毛の色を濃くする作用を持つ薬物であり、毛の色によりその活性が示されるものが含まれる。

【0022】このような使用態様に係る発明の一態様としては、(A) 上述のキメラ動物を被験動物として用意する段階、(B) 該被験動物をある一定の手段で処置し、こうして処置された被験動物の再構成毛包におけるメラノサイトの活性をモニターする段階、(C) 未処置対象(例えば、段階(B)の処置を行っていない被験動物の再構成毛包におけるメラノサイトの活性)に対する段階(B)の活性の変化の程度を該手段によるメラノサイトの活性化能と関連付ける段階、を含んでなるメラノサイトの活性化能の評価方法が挙げられる。

【0023】かような評価方法でメラノサイトの活性化能を、再構成毛包からの発毛のメラニン色素の多寡によって評価できる。また、発毛および毛の成長の程度により、毛乳頭、毛母細胞のいずれか一方または両方に、段階(B)の手段がいかに影響を及ぼしうるか、を評価できるであろう。かような手段としては、被験動物が置かれる環境、例えば、ストレス環境、それに対立するリラクセーションが図れる環境等、ならびに、被験動物の再構成毛包に塗布されるか皮下注入される薬物もしくはあらかじめメラノサイトを処理しておく薬物、あるいは経口投与される薬物を挙げることができる。また、薬物は再構成毛包を担持するキメラ動物を作出する際に、上記の毛包を再構成するための系に添加してもよい。

【0024】また、上記メラノサイトの活性のモニターは、ヒト由来メラノサイトを使用して再構成毛包を確立した場合には、メラニン合成経路のいずれかの酵素それら自体、またはそれらの酵素をコードするDNA、mRNA等について、それ自体公知のアッセイを使用して検出してもよい。別法として、キメラ動物の毛を抜去もしくは剪毛した後、新たに生えてくるかまたは成長してくる毛、あるいは毛の周期を繰り返して新たに生じた毛におけるメラニン含量を測定してもよい。

【0025】

【実施例】以下、具体例を挙げて本発明をより具体的に

説明するが、これらは本発明の理解を容易にする目的で提供するものであり、本発明の範囲を限定するものではない。

【0026】I. 各種細胞の調製例

例1: マウス由来毛乳頭細胞

(1-1) パーシカン(Versican)プロモーター下流に適当なマーカートンパク(例; LacZ)の構造遺伝子をつないだ発現ベクターを導入したトランスジェニックマウスから生まれた新生仔(生後4日以内に使用)のうち、LacZ陽性の個体を選別する。

(1-2) 各個体をエタノールと適当な洗浄液(例; リン酸緩衝生理食塩水。PBSと呼称)で洗浄後、背部皮膚を剥離し、0.25%トリプシン/PBS中で4℃下で一晩静置する。

(1-3) 翌日、ピンセットなどにより表皮と真皮を分離し、真皮側を0.35%コラゲナーゼ/DMEM(ダルベッコ変法イーグル最少培地。以下DMEMと呼称。)などにより37℃下で約1時間ほど処理する。

(1-4) (1-3)を念入りに懸濁操作を行なったのち、70μメートルのボアサイズを持つセルストレーナーに通し、次いで遠心分離器によって細胞を集める。

(1-5) 集めた細胞を適当なセルソーターを用いて、LacZ遺伝子の発現した細胞のみ回収し、適当な培養液(例; DMEMに10%のウシ胎児血清(FBSと呼称))で培養するか、使用前日まで通常の細胞凍結溶液で凍結保存する。

(1-6) 使用前日までに細胞を適当な培養条件(例; DMEM+10%中で5%CO₂存在下、37℃など)におき、翌日手術直前にトリプシンなどにより調製する。

【0027】例2: マウス由来表皮細胞

(2-1) 手術前日、アルビノの性質を持つマウス(例; ICR系統)の新生仔より(1-1)、(1-2)と同様の方法により皮膚をトリプシン処理する。

(2-2) ピンセットなどにより表皮部分のみ剥離し、細切後、適当な培養液(例; ケラチンサイト用培養液、以下KGMと呼称。)中で4℃で約1時間懸濁処理する。

(2-3) 70μメートルのボアサイズを持つセルストレーナーを通した(2-2)を遠心分離器にかけて表皮細胞を回収する。

(2-4) レシピエント動物1個体あたり、2匹の新生仔由来に相当する量の表皮細胞を手術に用いる。相当量の細胞をKGMで懸濁して、使用直前まで氷上に静置する。また、回収した細胞は凍結保存した後、使用前に解凍して用いることもできる

例3: マウス由来真皮細胞

(3-1) 手術前日、アルビノの性質を持つマウス(例; ICR系統)の新生仔より(1-1)、(1-2)と同様の方法により皮膚をトリプシン処理する。

(3-2) ピンセットなどにより表皮部分を剥離し、残った真皮を細切後、0.35%のコラゲナーゼを含んだ適当な培養液(例; DMEM+10%FBSなど)中で37℃で約1時間懸濁処理する。

(3-3) 100μメートルのボアサイズを持つセルストレーナーを通した(2-2)を遠心分離器にかけて真皮細胞を回収する。

【0028】レシビエント動物1個体あたり、2匹の新生仔由来に相当する量の真皮細胞を手術に用いる。これと単離毛乳頭細胞を同時に用いることはない。相当量の細胞をDMEM+10%FBSなどで懸濁して、使用直前まで氷上に静置するか、または凍結保存する。

【0029】例4: ヒト由来培養メラノサイト

(4-1) 市販の包皮由来メラノサイトを(例; Cascade社の販売している、NHEM細胞など。)メラノサイト用培養液(例Cascade社のM154s培地など)で培養する。手術当日までにレシビエント動物1個体あたり50万から1000万個に相当する量まで増殖させる。

(4-2) 使用直前に、0.05%トリプシン処理により培養器からはがし、培養液中に懸濁して、使用直前まで氷上に放置する。

【0030】例5: マウス由来メラノサイト

(5-1) 手術一週間以上前に新生仔マウス(実施例においては、C57Black/6系統を使用)より(1-1)、(1-2)に準ずる方法により皮膚を単離し、トリプシン処理する。

(5-2) 表皮を剥離後、0.02%EDTAを含んだPBS中に剥離表皮を浮かべる。

(5-3) 穏やかに混合した後、37℃中で約8分間振とうする。

(5-4) 70μメートルのセルストレーナーに通した後、細胞を遠心分離器により回収し、メラノサイト用の培養液中で培養する。培養条件は、細胞の状態による。

(5-5) 使用直前に、0.05%トリプシン処理により培養器からはがし、培養液中に懸濁して、使用直前まで氷上に放置するか、または凍結保存する。

【0031】II. 毛包再構成方法(動物への移植方法)

例II-1: マウス由来毛乳頭細胞を用いる場合
用意するもの; 下記II-(1-1)、(1-2)、(1-3)を適当量混合し、「再構成毛包作成手順」の「細胞懸濁液」として用いる。

II-(1-1) Versicanプロモーター下流に適当なマーカータンパク(例; LacZ)の構造遺伝子をつないだ発現ベクターを導入したトランスジェニックマウスの新生仔真皮から調製した毛乳頭細胞(Dermal Papilla; 以下DPと称)。再構成手術を行なう前日以前に調製し、手術当日にトリプシン処理

により回収する。

II-(1-2) マウス由来表皮細胞。手術前日、アルビノの性質を持つマウス(例; ICR系統)の新生仔より、皮膚を採取し、手術当日トリプシン処理により調製。こうして調製された細胞は凍結保存後に使用することもできる。

II-(1-3) 培養メラノサイト。(AまたはBを用いる)

A. ヒト由来メラノサイト。市販の包皮由来メラノサイトを継代培養したもの(例; Cascade社の販売している、NHEM細胞など)。手術当日トリプシン処理により調製。こうして調製された細胞は凍結保存後に使用することもできる。

【0032】B. マウス由来メラノサイト。新生仔マウス(実施例においては、C57Black/6系統を使用。)より手術一週間以上前に単離し、培養系に移して継代培養したもの。手術当日トリプシン処理により調製。こうして調製された細胞は凍結保存後に使用することもできる。

【0033】例II-2: マウス真皮を用いる場合
前記II-(1-1)に変わり、手術前日アルビノの性質を持つマウス(例; ICR系統)の新生仔より、皮膚を採取し、手術当日コラゲナーゼ処理により調製したものをを用いて「細胞懸濁液」を作成する。こうして調製された細胞懸濁液は凍結保存後に使用することもできる。

【0034】<再構成毛包作成手順>

用意するもの: レシビエント動物(例; Balb-c nu/un系統ヌードマウス。5週齢以上)、シリコン製の直径1センチ程度のドーム状キャップ(以下バルブと称)、麻酔薬、手術用ハサミ、ピンセット、縫合器マイクロピペッター

「細胞懸濁液」: メラノサイト、表皮細胞、真皮細胞あるいは毛乳頭細胞からなる。各細胞の調製方法は上述参照。細胞を培養液(DMEM+10%FBSなど)約150μl程度に懸濁し氷上に静置したものまたは凍結保存したものから手術直前に調製する。

【0035】<手順>

(i) ヌードマウスを麻酔。

(ii) 背部皮膚を直径1センチ弱に切り取る。

(iii) 傷口にバルブを挿入し、縫合器で固定する。

(iv) バルブ内に、細胞懸濁液をピペッターを用いて注入する。

(v) そのまま約1週間飼育し、バルブをはずす。

(vi) 1~2週間後、かさぶたが取れた跡に、再構成毛包の生育を観察することができ、メラノサイトを懸濁液に入れた場合には、本来アルビノの純白の毛色であるはずが灰色に変色することを観察できる。

(vii) この毛色がメラニン色素由来であることは、組織学的観察により明確にされる。

【0036】結果

以上、上記の各細胞および上記の手順に準じて作出した再構成毛包担持動物の具体的な条件（毛包を再構成するための系；+印が含まれる細胞である。）および毛の色および移植皮膚色について下記表-1にまとめて記載する。また、実験番号2、5、6、7、8および10で作

表-1

実験番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ヒト皮膚培養色素細胞(dark-skin)	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	
ヒト皮膚培養色素細胞(light-skin)	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-		
ヒト毛包由来培養色素細胞(アジア人)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-		+
マウス皮膚培養色素細胞(C57/black)	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-		
真皮細胞(ICRアルビノマウス)	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-		
表皮細胞(ICRアルビノマウス)	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-		
真皮細胞(B ⁶ /J ⁺ マウス)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+		
表皮細胞(B ⁶ /J ⁺ マウス)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
マウス単毛乳頭細胞	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+
再構成毛の毛色	無毛	白色毛	白色毛	白色毛	灰色毛	灰色毛	灰色毛	灰色毛	灰色毛	灰色毛	灰色毛	灰色毛

出された動物の背部の状態を表す図面に代わる写真を図1として添付する。

【0037】

【表1】

【0038】例III 抗白髪性薬物の評価

例II-2の<手順>に従い実験番号7の毛包を再構成するための系をヌードマウスへ移植し、約3～4週後に再構成された毛を抜去した。抜去後、それぞれ、幹細胞因子（以下、SCFと略記する）、 α -メラニン細胞刺激ホルモン（以下、MSHと略記する）、およびp-アミノ安息香酸（以下、PABAと略記する）を含有する溶液（それぞれ、動物の体重1g当たり、SCFの30ng、MSHの1pmolおよびPABAの50ng）、またはリン酸緩衝溶液（PBS：比較）を動物の皮下に毎日注射し、これを1週間繰り返した。

【0039】その後、再び再生される毛が十分成長した後（約3週間後）、再生毛を剪みにより刈り取り集め

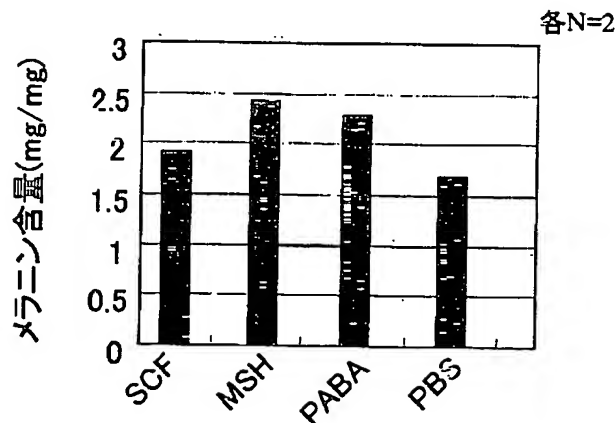
た。毛を溶解後、吸光度によりメラニン含量を定量した。結果を図2に示す。図より、各種因子の添加により再生毛中のメラニン含量が有意に増加することがわかる。したがって、本発明のキメラ動物は、少なくとも抗白髪性薬物のスクリーニングに使用できる。

【図面の簡単な説明】

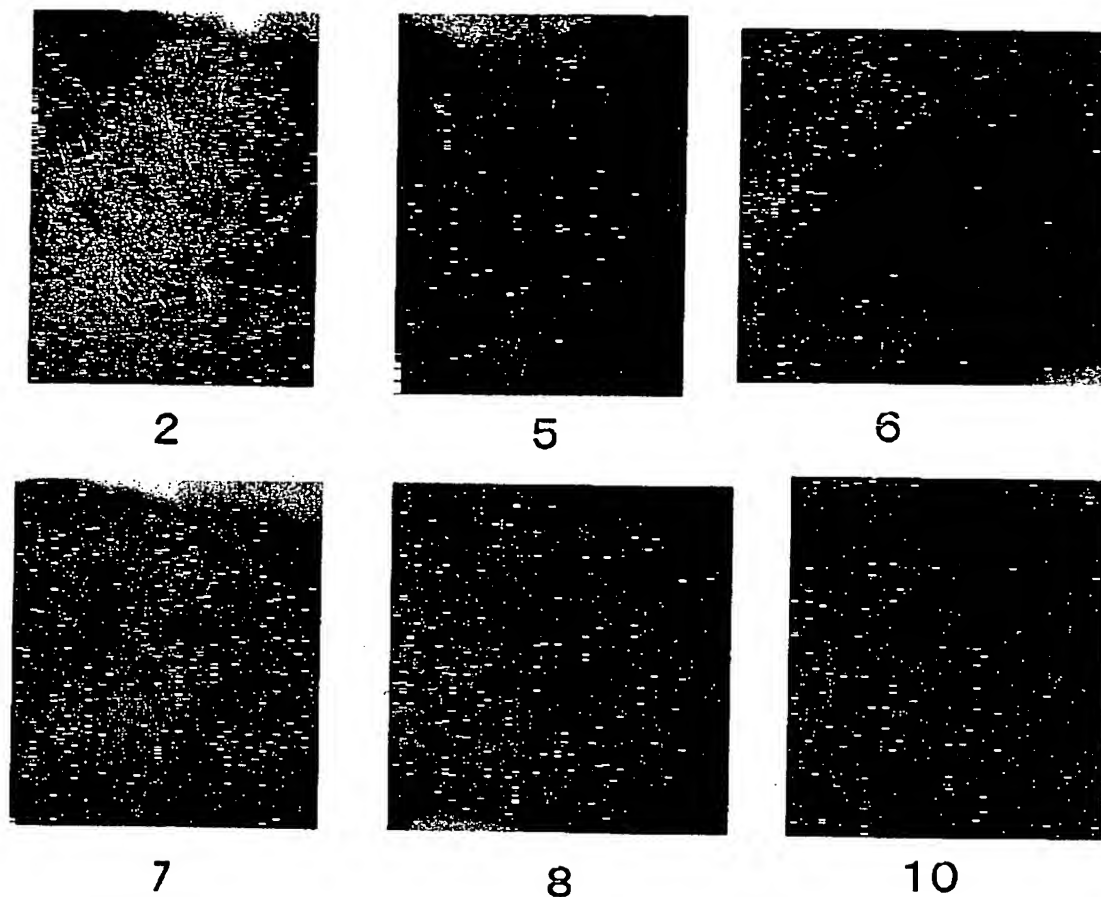
【図1】例II-2で作出されたキメラマウスの背部の状態を表す図面に代わる写真である。図中の数字は、それぞれ実験番号を表す。

【図2】例IIIにより数種の因子の作用下における本発明に従うキメラマウスの再生毛中のメラニン含量の変化を示すグラフである。

【図2】



【図1】



フロントページの続き

(51)Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	(参考)
C 1 2 Q 1/02		C 1 2 N 5/00	B
// C 1 2 N 15/09		15/00	A

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA20 GA18 GA30 HA20
 4B063 QA01 QA05 QA20 QQ02 QQ08
 QQ21 QQ41 QQ61 QQ89 QR72
 QR77 QS14 QX01
 4B065 AA91X AA93X AB10 AC20
 BA30 BB01 BC50 CA43 CA44
 CA50 CA60
 4C084 AA17 NA14 ZA922 ZB212

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.